额颞叶痴呆家族史未患病者尿液蛋白质组与健康人不同

苏妍[1]，褚敏[2]，王海彤[1]，高友鹤[1]*，武力勇[2]*

（1. 北京师范大学 生命科学学院 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100875），（2.首都医科大学宣武医院 神经内科 北京 100053）

摘要：额颞叶痴呆（Frontotemporal Dementia，FTD）是神经系统退行性痴呆中非常常见的一类疾病，是 65 岁以下人群痴呆的主要原因，具有很强的遗传性。该研究通过对 FTD 家族史未患病者人群和健康人群进行尿蛋白质组学分析，探寻在现有诊断手段下未鉴定出 FTD 的人是否存在与健康人有差异的尿液蛋白质和生物学通路。结果显示，两组之间存在 387 种差异显著（$P<0.01$; $FC\geq2.0$ 或≤0.5）的蛋白质，其中多种蛋白已被报道在 FTD 或神经系统中发挥作用，特别是 Progranulin (PGRN)，被认为是 FTD 的一种有效的生物标志物。在差异蛋白富集到的 139 个生物学通路（$P<0.01$）中，有多种与神经元、神经系统直接相关的通路，包括神经胶质细胞和小胶质细胞。FTD 家族史未患病者尿蛋白质组与健康人之间的不同，使得尿液蛋白质组学有潜力在探寻 FTD 潜在患病人群、探究 FTD 早期发生及发展相关机制方面提供线索，为 FTD 的预防工作以及早期诊断工作开拓了全新的视野。

关键词：额颞叶痴呆；尿液；蛋白质组学

Changes in urine proteins of unaffected individuals with a family history of frontotemporal dementia

Yan Su[1], Min Chu[2], Haitong Wang[1], Youhe Gao[1]*, Liyong Wang[2]*

（1. Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, College of Life Sciences， Beijing Normal University, Beijing 100871, China), (2. Neurology, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053)

Abstract：Frontotemporal dementia (FTD) is a very common type of neurodegenerative dementia and is the main cause of dementia in people under 65 years old. It has strong heritability. To explore whether there are urine

---

基金项目：北京师范大学（11100704）

作者简介：1.苏妍（一作），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物；2. 褚敏（一作），女，博士后，主要研究方向：额颞叶痴呆机制；3. 王海彤（二作），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物。

通信联系人：1.高友鹤（第一通讯），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物。E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn；2. 武力勇（第二通讯），男，教授，博士生导师，主要研究方向：额颞叶痴呆机制。E-mail: wmywly@hotmail.com。

proteins and biological pathways that are different between those who have not been identified with FTD under existing diagnostic methods and healthy people, this study conducts urinary proteomics analysis on people without disease with a family history of FTD and healthy people. The results show that there are 387 significantly different proteins (P<0.01; FC≥2.0 or ≤0.5) between the two groups. Among them, many proteins have been reported to play a role in FTD or the nervous system. In particular, Progranulin (PGRN) is considered an effective biomarker for FTD. Among the 139 biological pathways enriched by differential proteins (P<0.01), there are many pathways directly related to neurons and the nervous system, including glial cells and microglia. The differences in urinary proteomes between people without disease with a family history of FTD and healthy people make urinary proteomics have the potential to provide clues in exploring potential FTD patient populations and exploring the mechanisms related to the early occurrence and development of FTD, opening up a new perspective for FTD prevention and early diagnosis.

Key words: Frontotemporal Dementia; urine; Proteomics

1 前言

1.1 额颞叶痴呆及其研究现状

额颞叶痴呆（Frontotemporal Dementia，FTD）是一种进行性神经退行性疾病，主要影响大脑的前额叶和颞叶区域。这些区域负责控制行为、语言、情绪以及决策能力，因此 FTD 患者会出现认知和行为功能损害、语言障碍、行为和情绪变化、空间导向能力减退、判断力和决策能力下降等症状，随着时间推移进展为更全面的痴呆，同时可合并其他运动障碍如肌萎缩侧索硬化等[1]。FTD 是神经系统退行性痴呆中非常常见的一类疾病，好发于 45~64 岁的中老年人，是 65 岁以下人群痴呆的主要原因，因此被认为是一种早发性痴呆[2][3]。FTD 的病程为 2-20 年，平均约 8 年，预后较差，患者多死于肺部感染、泌尿系感染和压疮等并发症[4]。

FTD 的病因尚不完全清楚，但可能与遗传、基因突变等因素有关。有研究显示，FTD 显示出很强的遗传性，30-50% 的患者有阳性家族史[5][6]。研究人员在大约 50% 的家族病例中鉴定出了 MAPT 和颗粒蛋白前体（*GRN*）基因的突变，在少数家系中发现了 *VCP*、*CHMP2B*、*TARDP* 和 *FUS* 基因的罕见缺陷[7][8]。

目前，FTD 尚无特效治愈方法，治疗以对症、锻炼为主。通过综合治疗和护理措施来提高患者的生活质量和延缓病情进展，包括药物治疗（如乙酰胆碱酯酶抑制剂、抗焦虑、抗抑郁药物等）、康复治疗（如认知训练、功能训练等）、行为治疗、营养治疗、亲属教育、心

理疏导和社交参与等。早期诊断、早期干预可以显著的改善 FTD 患者的生活质量和预后[9][10][11]。

FTD 的临床诊断主要是依据神经心理学评估、神经影像学检查、脑脊液和血浆生物标志物检测[7][12]。执行功能受损是 FTD 的特征，但在疾病早期，执行功能障碍可能不存在或被明显的行为变化所掩盖，并且由于 FTD 部分类型中出现和阿尔兹海默症早期相似的症状如情景记忆障碍等，因此很难使用标准神经心理学测试在早期区分 FTD 和 AD。尽管现有的神经影像学检查手段可以帮助区分 FTD 和 AD，但是只有当疾病进展到一定程度，大脑的结构和功能变化较为明显时，神经影像学才能检测到异常，无法在疾病发生的最早期发挥鉴定作用。此外，由于病理异质性和神经退行性严重程度的巨大差异，脑脊液生物标志物能可靠识别 FTD 的能力有限；并且由于机体稳态机制的调控，脑脊液和血液无法较早期的发现疾病的开始[7][13]。因此，需要一些更加敏感的检测手段来实现 FTD 的更早期诊断。

1.2 尿液生物标志物

尿液蛋白质组具有作为下一代生物标志物的巨大潜力。首先，尿液不受机体稳态机制的调控，能够敏感的反应机体早期的生理或病理变化，可以在疾病的早期诊断方面发挥重要的作用[14]。其次，尿液易于收集、保存和分析，可通过将尿蛋白直接结合到 PVDF 膜上实现长期的冷冻保存[15]。尿液的以上特点决定了它可以作为一种非常有潜力的生物标志物，在生理学和病理生理学的研究中最大限度地发挥更重要的作用。

在尿液蛋白质组学的研究中，使用动物模型可以方便地控制变量、最大程度地减少相关因素的干扰，使得在疾病发生和发展的极早期能够采集样本[16][17]。已有多项动物模型的研究结果表明，尿液蛋白质组在疾病诊断方面可以早于血液、症状、体征、影像和病理的检测，目前尿蛋白质组在肝脏、肾脏、脑、肺脏等多种器官的多种疾病研究，如肿瘤、退行性疾病、炎症等，已然验证了尿蛋白质组在早期诊断方面的潜力[18][13][19][20][21][22][23]。

尿液蛋白质组学已被应用于多种人类疾病的研究，并且在寻找某些疾病早期诊断生物标志物过程中，尿液蛋白质组学已经展现出了巨大的潜力，在未来临床应用中前景广阔。Rubio-Sánchez R 等[24]首次研究了阴道毛滴虫感染患者阴道分泌物和尿液中存在的微生物以寻找挥发性生物标志物，发现挥发性化合物如 2-辛烯-1-醇和 3-壬酮可作为尿液样本中的生物标志物，在阴道分泌物中发现的 3-羟基-2，4，4-三甲基戊基-2-甲基丙酸酯与滴虫病患者的尿液高度相关。此外，寻找尿液中蛋白质组的变化，是用于早期发现泌尿系统和一些系统性恶性肿瘤的诊断标志物的一种重要的方法，尤其在膀胱癌的研究中大放异彩，以往已经发

现许多移行细胞癌的潜在标志物，血红蛋白、肿瘤相关胰蛋白酶抑制剂、可溶性钙黏蛋白 E、透明质酸酶等，其中一些已经用于临床[25]。

因此，本研究通过对额颞叶痴呆家族史未患病者人群和健康人群进行尿蛋白质组学分析，以探究在现有诊断手段下未鉴定出 FTD 的人是否存在与健康人有差异的尿液标志物和生物学通路，旨在将 FTD 的诊断推向更早期，并为 FTD 的预防和治疗提供依据、线索。

2　材料与方法

2.1 尿液样品的收集

本研究获得了宣武医院伦理委员会的批准（临研审[2023]036 号）。所有参与者均提供了书面知情同意书，参与者来自宣武医院，样本采集时间为 2023 年 8 月 26 日。参与者样本包含 6 例额颞叶痴呆家族史未发病者样本，1 例额颞叶痴呆患者样本。收集的尿液样本都放入-80℃冰箱保存。健康人样本来自于已发表预印本关于新冠的研究，共 11 例[26]。

表 1 收集的样本信息与统计结果

样本信息		健康（n=11）	额颞叶痴呆家族史未患病者（n=6）	额颞叶痴呆患者（n=1）
年龄	平均值	42.9±6.5	43.3±9.7	59±0
	年龄范围	34-56	33-61	59

2.2 尿液样品的处理

尿蛋白的提取：尿样解冻后，12000×g、4℃条件下离心 20min，将上清液转移至新 EP（eppendorf）管中。随后加入二硫苏糖醇溶液（Dithiothreitol, DTT, Sigma）至终浓度为 20mM，金属浴 37℃加热 60min 后晾凉至室温，再加碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma）至终浓度 50mM，常温避光放置 40min。加入四倍体积的无水乙醇，混匀后-20℃冰箱沉淀 24 小时。第二天将混合液于 12000×g、4℃条件下离心 30min，弃去上清后将蛋白沉淀重悬于裂解液（含 8 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，25 mmol/L 二硫苏糖醇，50 mmol/L）中。再次于 12000×g、4℃条件下离心 30min，保留上清液。使用 Bradford 方法测量蛋白质的浓度。

蛋白酶解：取 100μg 尿蛋白样品到 EP 管中，加入 25 mmol/L NH^4HCO^3 溶液使总体积为 200μL 作为样本备用。接下来对 10 kDa 超滤管的滤膜（Pall, Port Washington, NY, USA）进行洗膜操作：先加入 200μL UA 溶液（8 mol/L 尿素，0.1 mol/L Tris-HCl，pH 8.5），于

14000×g、18℃条件下离心 10min，重复 2 次；将上述准备好的样本加入超滤管于 14000×g、18℃条件下离心 40min；再加入 200μL UA 溶液，于 14000×g、18℃条件下离心 30min，重复 2 次；随后加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液，于 14000×g、18℃条件下离心 30min，重复 2 次；最后按照胰酶：蛋白为 1：50 的比例加入胰蛋白酶（Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA），在 37℃条件下孵育过夜。过夜后，离心收集酶解后的滤液，通过 Oasis HLB 固相萃取柱进行除盐处理后真空干燥，得到肽段冻干，置于-80℃保存。

2.3 LC-MS/MS 串联质谱分析

用 0.1%甲酸水复溶肽段，将肽段浓度稀释至 0.5 μg/μL。通过 Thermo ESAY-Nlc1200 液相系统进行分离，参数设置为：洗脱时间 90 分钟，洗脱梯度为（A 相：0.1%甲酸；B 相：80%乙腈）。通过 Orbitrap Fusion Lumos Tribird 质谱仪对分离后的肽段重复进行三次数据依赖质谱数据采集，采用数据非依赖型采集模式。

2.4 数据库搜索

使用 Spectronaut Pulsar（Biognosys AG, Switzerland）软件对质谱仪采集结果的 raw 文件进行数据库检索，使用 SwissProt Human 数据库进行对比。通过将 MS2 中各自片段离子的峰面积相加，计算出肽的丰度。蛋白质强度由各自的肽丰度相加计算蛋白质丰度。

2.5 统计分析与生物信息分析

每一个样品均进行 3 次技术重复，将获得的数据取平均值后用于统计学分析。本实验进行 FTD 家族史未患病组和健康组的成组比较对比，筛选差异蛋白，差异蛋白筛选条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥2 或 ≤0.5，双尾非配对 t 检验分析的 P 值 ＜ 0.01。筛选到的差异蛋白通过 Uniprot 网站（https://www.uniprot.org）查询名称及功能，通过 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov）进行生物学功能富集分析。并在 Pubmed 数据库（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov）中检索已报道文献，从而对差异蛋白进行功能分析。

3 结果与讨论

3.1 FTD 家族史未患病组与健康组尿液蛋白质组比较

3.1.1 差异蛋白

将 FTD 家族史未患病组与健康组尿液蛋白质进行比较，筛选差异蛋白条件为：变化倍数 FC 值（健康人尿液样本鉴定的蛋白数与 FTD 家族史未患病者尿液样本鉴定的蛋白数的比值）≥ 2 或 ≤ 0.5，双尾非配对 t 检验 $P < 0.01$。结果表明，相对于健康组，FTD 家族史未患病组共鉴定到 387 个差异蛋白，其中 374 种下调，13 种上调。将差异蛋白按 FC 由小到大的顺序排列，通过 Uniprot 进行检索，详细信息列于附表 1。将差异蛋白下调最多的前 20 个蛋白、上调的 13 个蛋白信息列于表 2 中。

表 2 FTD 家族史未患病组与健康组 FC≥2.0 或≤0.5，P<0.01 筛选的差异蛋白中下调最多的前 20 个蛋白、上调的 13 个蛋白信息

Uniprot ID	Protein names	Fold change	P value	Trend
P05106	Integrin beta-3	0.000	0.000	↓
P30486	HLA class I histocompatibility antigen, B alpha chain	0.000	0.006	↓
Q13467	Frizzled-5	0.000	0.000	↓
Q13705	Activin receptor type-2B	0.000	0.002	↓
Q6UXH9	Inactive serine protease PAMR1	0.000	0.000	↓
Q7Z4P5	Growth/differentiation factor 7	0.000	0.003	↓
Q9NQ34	Transmembrane protein 9B	0.000	0.001	↓
Q9NRR1	Cytokine-like protein 1	0.000	0.001	↓
P26012	Integrin beta-8	0.001	0.000	↓
A0A0C4DH35	Probable non-functional immunoglobulin heavy variable 3-35	0.003	0.000	↓
P01782	Immunoglobulin heavy variable 3-9	0.003	0.000	↓
A0A087WW87	Immunoglobulin kappa variable 2-40	0.004	0.002	↓
Q86UP0	Cadherin-24	0.004	0.003	↓
P23434	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	0.005	0.000	↓
O75581	Low-density lipoprotein receptor-related protein 6	0.015	0.004	↓
P0DP01	Immunoglobulin heavy variable 1-8	0.015	0.000	↓
Q01628	Interferon-induced transmembrane protein 3	0.015	0.000	↓
Q7KYR7	Butyrophilin subfamily 2 member A1	0.018	0.000	↓

P35556	Fibrillin-2 [Cleaved into: Placensin]	0.018	0.006	↓
O75015	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B	0.022	0.001	↓
Q9H008	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	2.036	0.005	↑
O75368	Adapter SH3BGRL	2.048	0.003	↑
Q9BRT3	Migration and invasion enhancer 1	2.182	0.005	↑
P20339	Ras-related protein Rab-5A	2.274	0.001	↑
Q9Y3B8	Oligoribonuclease, mitochondrial	2.672	0.003	↑
P35475	Alpha-L-iduronidase	2.756	0.002	↑
O15305	Phosphomannomutase 2	2.941	0.008	↑
Q8N5J2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-1	4.962	0.009	↑
Q9BXF6	Rab11 family-interacting protein 5	5.485	0.009	↑
Q9BXD5	N-acetylneuraminate lyase	8.892	0.008	↑
Q2TAA2	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	11.306	0.002	↑
P62857	Small ribosomal subunit protein eS28	18.283	0.007	↑
P09493	Tropomyosin alpha-1 chain	1240.937	0.009	↑

3.1.2 随机分组

将 FTD 家族史未患病者样品（n=6）和健康人样品（n=11）随机分成两组，共有 12376 种分组，在所有随机组合类型中，按照相同的筛选条件计算所有随机次数的差异蛋白平均数为 14.49。这些结果表明，随机生成的差异蛋白为 14.49 个，筛选差异蛋白的可信度为 96.3%。说明 FTD 家族史未患病组尿液蛋白质组的差异蛋白相对于健康组的变化十分显著。

3.1.3 差异蛋白功能分析

将鉴定到的差异蛋白于 Pubmed 数据库进行文献检索。

其中，下调幅度最大、变化为“从有到无”的差异蛋白有 8 个，分别为 Integrin beta-3、HLA class I histocompatibility antigen (B alpha chain)、 Frizzled-5、 Activin receptor type-2B、Inactive serine protease PAMR1、 Growth/differentiation factor 7、 Transmembrane protein 9B、Cytokine-like protein 1，已有文献证明的与神经疾病、神经系统的生理过程有关的蛋白如下：

①Integrin beta-3：神经炎症涉及细胞因子释放、星形胶质细胞的反应性和迁移，神经元

Thy-1 可通过结合 Integrin beta-3 和 syndecan-4 促进星形胶质细胞迁移[27]。

②Frizzled-5 : Frizzled-5 是 Wnt 蛋白（WNT2、WNT10B、WNT5A）的受体，研究发现 Frizzled 5 对于成年束旁核神经元的存活是持续且细胞自主需要的，且 Wnt-Frizzled 信号通路的缺陷可能是退行性中枢神经系统疾病中神经元丢失的原因[28]。

③Activin receptor type-2B：在鸡的睫状神经节发育过程中，研究者发现激活素受体 2B 的信号传导在神经系统发育过程中的细胞死亡调控中具有重要作用，其表达的下调会导致神经元凋亡的失调，影响体内的神经发育程序性细胞死亡，同时阻碍脉络膜神经元的分化[29]。

④Growth/differentiation factor 7（GDF7）:小脑颗粒神经元在小脑功能中起着关键的作用，与表达许多颗粒神经元标志物的菱形唇细胞相邻的背侧中线细胞，表达了 Bmp6、Bmp7 和 GDF7，这三个基因编码骨形态发生蛋白（BMP）家族的肽生长因子，包含 GDF7 在内的这些 BMPs 诱导培养了神经组织中颗粒神经元标志物的表达[30]。

在 13 个上调的差异蛋白中，Tropomyosin alpha-1 chain 在 FTD 家族史未患病者组中上调了近 1241 倍，但是目前暂未有报道与额颞叶痴呆或神经疾病相关。此外，Rab11 family-interacting protein 5（FC=5.485，P=0.009），有研究表明 Rab11 主要在回收包括对信号转导很重要的受体等多种蛋白质方面发挥关键作用，从而维持神经细胞的功能活性，Rab11 family-interacting protein 具有 Rab 结合结构域并介导与 Rab GTP 酶的 GTP 依赖性相互作用[31]; 研究者在一些神经退行性疾病中观察到 Rab11 的表达降低，这表明 Rab11 及其相关蛋白可能是治疗干预的潜在靶点[32]。另有，Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-1（FC=4.962，P=0.009），是一种在脑细胞中明显表达的蛋白，其水平与神经元脑损伤的程度和血脑屏障的破坏有关，在脑损伤的急性期可以在脑脊液或血液中检测到，这表明神经系统损伤[33][34]。最后，Alpha-L-iduronidase（IDUA）（FC=2.756，P=0.005），可能通过与微管结合的马达蛋白相互作用，沿着微管进行运输，这种运输方式可以确保 IDUA 可以在神经元内进行高效的轴突 - 树突运输，而神经元损伤可能会导致 IDUA 从神经元中释放出来[35]。

值得一提的是，我们筛选到的差异蛋白中出现了 Progranulin （PGRN）（FC=0.284，P=0.001）。PGRN 由 GRN 基因编码，是一种分泌蛋白，通过细胞间信号传导和信号转导实现其功能，与细胞增殖、伤口修复和生长因子有关。在已有的多项研究中显示，GRN 突变可以导致 PGRN 单倍体不足，最终导致 FTD，被认为是一种有效的生物标志物[8] [36][37]。并且 GRN 突变可能是通过降低 PGRN 的表达量、分泌以及影响亚细胞定位等方面，从而影响其正常功能[38]。

此外，还有其他的已有报道的与 FTD 或神经疾病相关的蛋白。Vascular endothelial growth factor A, long form（L-VEGF）（FC=0.225，P=0.004）的水平升高与神经发生、学习和神经保护作用有关，但也可能增加血管通透性，并在高浓度下具有神经毒性[39]。Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor（FC=0.225，P=0.007）可以激活小胶质细胞、促进炎症反应，并且与神经元的死亡和认知功能下降有关，有研究发现 PGRN 缺乏会导致小胶质细胞中 NF-κB 过度激活和 TNF-α 信号升高，进而导致伏隔核中的中型多棘神经元过度兴奋和强迫症样行为[40]。TGF-beta receptor type-2（TGFR-2）（FC=0.378，P=0.005）被报道过在 FTD 患者脑脊液中的水平升高。我们还发现了 Metalloproteinase inhibitor 3（TIMP-3）（FC=0.052，P=0.004）的变化，虽然暂无报道 TIMP-3 与神经系统疾病的关系，但研究显示其家族成员 TIMP-1 和 TIMP-2 的水平在 FTD 患者中发生变化[41][42]。

我们的研究表明，FTD 家族史未患病者组相对于健康组的差异蛋白中，有大量变化显著的蛋白已经被报道与 FTD 或神经系统相关，此外还有一些变化十分显著的差异蛋白仍未有研究报道其与 FTD 或神经系统的关系，或许可以对这些蛋白在 FTD 或神经方面的功能做进一步的研究，以期寻找 FTD 早期筛查的生物标志物或潜在的药物靶点。

3.1.4 差异蛋白富集生物学过程分析

使用 DAVID 数据库对成组分析鉴定到的 387 个差异蛋白进行生物学过程（Biological process, BP）富集分析。结果显示，共有 139 个 BP 通路被显著富集（P<0.01），详细信息列于附表 2。

富集到的 P 值最低的三个生物学通路为 cell adhesion，heterophilic cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules，cell-cell adhesion，均与黏附相关。细胞黏附分子（Cell adhesion molecules，CAMs）可以促进白细胞与内皮细胞的相互作用，使白细胞进入大脑，引发炎症反应；另一方面，一些 CAMs 可以促进小胶质细胞的吞噬作用，清除 Aβ 等病理产物，但过度激活的小胶质细胞也可能释放炎症因子，加重神经损伤[43]。

同时，我们富集到了很多神经元、神经系统直接相关的通路，如图 1a 所示。多项研究表明神经胶质细胞和小胶质细胞是 FTD 的关键致病因素[44][45]。神经胶质细胞包括星形胶质细胞、少突胶质细胞等多种类型，它们为神经元提供支持和保护，参与神经系统的发育、修复和免疫反应，星形胶质细胞可能通过释放炎症因子等方式参与 FTD 的发展，也可能参与了异常蛋白的聚集过程、进一步导致神经元的损伤和死亡[46][47]。小胶质细胞作为中枢神经系统的常驻免疫细胞，在神经炎症、神经退行性疾病等方面发挥着关键作用，并且小胶质细

胞还在突触修剪中发挥作用，突触修剪是消除健康发育大脑中多余突触的过程，已有研究发现 FTD 脑中通常会出现小胶质细胞增生和星形胶质细胞增多[44]。此外，FTD 患者的脑组织学可见受累皮层微空泡变性、神经元脱失、部分可见神经元肿胀、白质脱髓鞘改变和胶质细胞增生，有些基底节、黑质有严重的神经元丢失，证明上述我们富集到的生物学通路的确与 FTD 的发生发展相关[48]。

在这些生物学过程中，也有很多与炎症免疫相关，如图 1b 所示。神经元功能障碍/死亡、异常蛋白质积累、中枢免疫系统激活是 FTD 病理进展的主要因素，异常的蛋白质构象和积累会激活免疫系统，从而导致神经炎症[49]。白质高信号通常反映了脑部血管和神经组织的异常，而在 FTD 患者中发现了额叶严重的白质高信号，这种白质高信号与广泛的白质脱髓鞘和小胶质细胞营养不良有关，由于小胶质细胞是神经系统中的免疫细胞，其营养不良可能导致免疫功能失调，进而加重神经炎症，因此神经炎症可能在白质病变中起到重要作用[50]。

此外，脑微出血在神经认知障碍中很常见，并且已发现了增加包括阿尔兹海默症等痴呆的风险，这可能是通过纤维蛋白原诱导的脊柱消除激活小胶质细胞中的神经炎症和神经退行性过程，解释了 blood coagulation 等生物学过程的出现[51]。

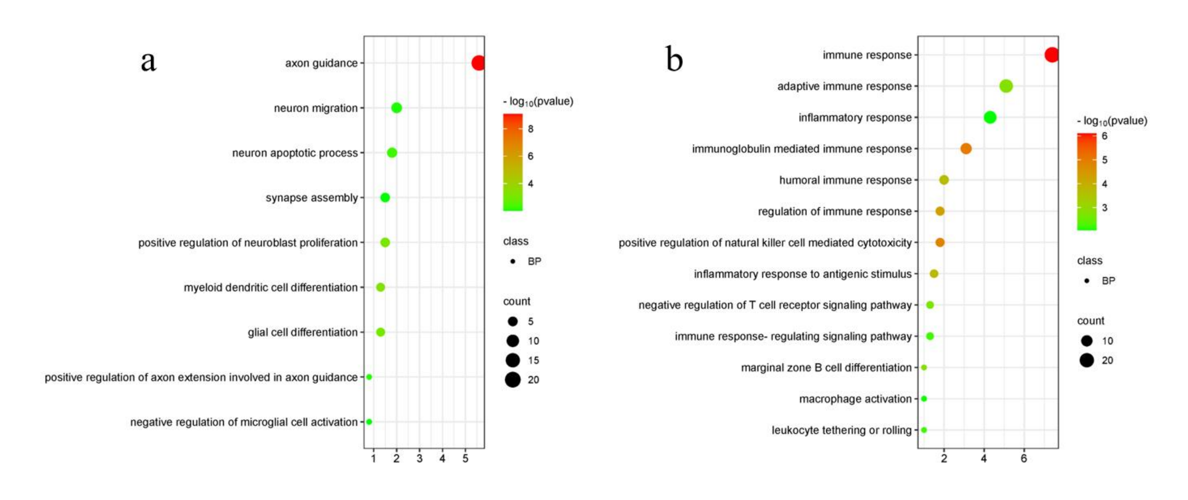


图 1 FTD 家族史未患病者组与健康组差异蛋白富集到的生物学过程。a. 神经元、神经系统相关通路; b. 炎症免疫相关通路。

3.2 FTD 家族史未患病者、FTD 患者、健康人样本的聚类分析

对 FTD 家族史未患病者、FTD 患者、健康人样本（序号 1-6 为 FTD 家族史未患病者，7 为 FTD 患者，H1-H11 为健康人）的总蛋白做层聚类分析，将具有相同或相似表达模式的蛋白进行聚类，得到总蛋白聚类分析图（图 2）。由图可知，所有样本中仅有一个健康人样本（H7）未与 FTD 家族史未患病者分开，进一步证明了 FTD 家族史未患病者的总蛋白与健

康人的总蛋白具有不同的特征。

我们还注意到了一个有趣的现象，在聚类分析的图中出现了同一家族成员的聚集（序号1、2、3、4、6为同一个家族的成员，序号5、7为另一个家族的成员）。Mann 等在帕金森的研究中也出现了相似的现象[52]。但是本实验 FTD 样本的两个家族来自不同的地域（辽宁省、河北省），以往的研究显示，中国不同地区人的尿液蛋白质组具有明显的地域差异。地域对人尿蛋白质也具有很大的影响，因此家系聚集现象还需要更进一步的探索[53]。

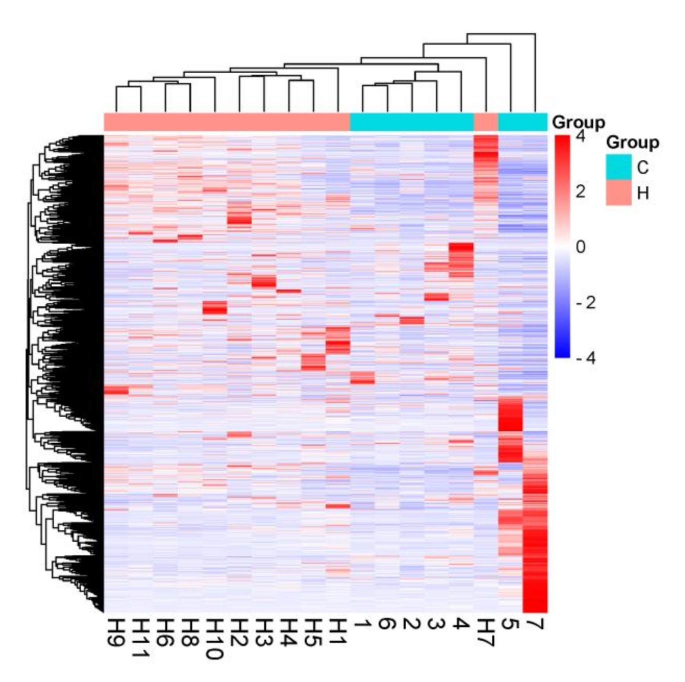


图 2 FTD 家族史未患病者、FTD 患者、健康人样本总蛋白的聚类分析（1-6 为 FTD 家族史未患病者，7 为 FTD 患者，H1-H11 为健康人）

4 结论

本研究通过对 FTD 家族史未患病者人群和健康人群进行尿蛋白质组学分析，发现尿液蛋白质组学可以明显区分 FTD 家族史未患病者和健康人。FTD 家族史未患病者存在着与健康人有差异的蛋白质和生物学通路，并且其中很多的差异蛋白和生物学通路已被报道与 FTD 直接相关，或与神经疾病、神经系统具有相关性。其他未被在 FTD 或神经系统疾病方向研究过的蛋白质和通路，也值得进一步的研究，以探寻其在神经方面的作用。

这些发现提示了尿液蛋白质组学在寻找 FTD 的潜在患病人群、探究 FTD 早期发生发展的相关机制的潜力，为 FTD 的预防和早期诊断提供了新的视角，这值得研究者进一步的长期研究。

参考文献：

[1] McKhann GM, Albert MS, Grossman M, et al. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. Arch Neurol 2001;58:1803–9.

[2] Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, et al. The prevalence of frontotemporal dementia. Neurology 2002;58:1615–21.

[3] Harvey RJ, Skelton-Robinson M, Rossor MN. The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003;74:1206–9.

[4] Seelaar H, Kamphorst W, Rosso SM, et al. Distinct genetic forms of frontotemporal dementia. Neurology 2008;71:1220–6.

[5] Rosso SM, Donker Kaat L, Baks T, et al. Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain* 2003;*126*:2016–2022.

[6] Johnson JK, Diehl J, Mendez MF, et al. Frontotemporal lobar degeneration: demographic characteristics of 353 patients. *Arch Neurol* 2005;*62*:925–930.

[7] Seelaar H, Rohrer JD, Pijnenburg YA, Fox NC, van Swieten JC. Clinical, genetic and pathological heterogeneity of frontotemporal dementia: a review. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2011 May;82(5):476-86. doi: 10.1136/jnnp.2010.212225. Epub 2010 Oct 22. PMID: 20971753.

[8] Sevigny J, Uspenskaya O, Heckman LD, Wong LC, Hatch DA, Tewari A, Vandenberghe R, Irwin DJ, Saracino D, Le Ber I, Ahmed R, Rohrer JD, Boxer AL, Boland S, Sheehan P, Brandes A, Burstein SR, Shykind BM, Kamalakaran S, Daniels CW, David Litwack E, Mahoney E, Velaga J, McNamara I, Sondergaard P, Sajjad SA, Kobayashi YM, Abeliovich A, Hefti F. Progranulin AAV gene therapy for frontotemporal dementia: translational studies and phase 1/2 trial interim results. Nat Med. 2024 May;30(5):1406-1415. doi: 10.1038/s41591-024-02973-0. Epub 2024 May 14. PMID: 38745011; PMCID: PMC11108785.

[9] Jicha GA. Medical management of frontotemporal dementias: the importance of the caregiver in symptom assessment and guidance of treatment strategies. J Mol Neurosci. 2011 Nov;45(3):713-23. doi: 10.1007/s12031-011-9558-7. Epub 2011 Jun 7. PMID: 21647712; PMCID: PMC3208136.

[10] Boxer AL, Boeve BF. Frontotemporal dementia treatment: current symptomatic therapies and implications of recent genetic, biochemical, and neuroimaging studies. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2007;21:S79–S87.

[11] Tsai RM, Boxer AL. Therapy and clinical trials in frontotemporal dementia: past, present, and future. J Neurochem. 2016 Aug;138 Suppl 1(Suppl 1):211-21. doi: 10.1111/jnc.13640. Epub 2016 Jun 15. PMID: 27306957; PMCID: PMC5217534.

[12] Keyserling H, Mukundan S Jr. The role of conventional MR and CT in the work-up of dementia patients.

Neuroimaging Clin N Am. 2005 Nov;15(4):789-802, x. doi: 10.1016/j.nic.2005.09.012. PMID: 16443491.

[13] Zhao M, Li M, Li X, et al. Dynamic changes of urinary proteins in a focal segmental glomerulosclerosis rat model[J]. Proteome Sci 2014; 12: 42.

[14] Gao Y. Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery? Sci China Life Sci. 2013 Dec;56(12):1145-6. doi: 10.1007/s11427-013-4574-1. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24271956.

[15] Qin W, Du Z, Gao Y. Collection and preservation of urinary proteins, using a fluff pulp diaper. Sci China Life Sci. 2018 Jun;61(6):671-674. doi: 10.1007/s11427-016-9060-2. Epub 2018 Jan 4. PMID: 29318498.

[16] Jing J, Gao Y. Urine biomarkers in the early stages of diseases: current status and perspective. Discov Med. 2018 Feb;25(136):57-65. PMID: 29579412.

[17] Gao Y. On Research and Translation of Urinary Biomarkers. Adv Exp Med Biol. 2021;1306:101-108. doi: 10.1007/978-3-030-63908-2_7. PMID: 33959908.

[18] Li M, Zhao M, Gao Y. Changes of proteins induced by anticoagulants can be more sensitively detected in urine than in plasma[J]. Sci China Life Sci 2014; 57: 649–56.

[19] Zhang F, Ni Y, Yuan Y, et al. Early urinary candidate biomarker discovery in a rat thioacetamide-induced liver fibrosis model[J]. Sci China Life Sci 2018; 61: 1369–81.

[20] Ni Y, Zhang F, An M, et al. [Changes of urinary proteins in a bacterial meningitis rat model] [J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao Chin J Biotechnol 2017; 33: 1145–57.

[21] Wu J, Li X, Zhao M, et al . Early Detection of Urinary Proteome Biomarkers for Effective Early Treatment of Pulmonary Fibrosis in a Rat Model[J]. PROTEOMICS - Clin Appl 2017; 11: 1700103.

[22] Wu J, Guo Z, Gao Y. Dynamic changes of urine proteome in a Walker 256 tumor-bearing rat model[J]. Cancer Med 2017; 6: 2713–22.

[23] Zhang F, Wei J, Li X, et al. Early Candidate Urine Biomarkers for Detecting Alzheimer’s Disease Before Amyloid-β Plaque Deposition in an APP (swe)/PSEN1dE9 Transgenic Mouse Model[J]. J Alzheimers Dis 2018; 66: 613–37.

[24] Rubio-Sánchez R， Ríos-Reina R， Ubeda C. Identification of volatile biomarkers of Trichomonas vaginalis infection in vaginal discharge and urine. Appl Microbiol Biotechnol. 2023 Mar 31. doi: 10.1007/s00253-023-12484-6. Epub ahead of print. PMID: 37000228.

[25] Zhou H，Yuen PS，Pisitkun T，et al.Collection，storage，preservation，and normalization of human urinary exosomesfor biomarker discovery. Kidney Int，2006，69(8):1471-6.

[26] Sun J, Wei J, Yu H, Sun H, Liu X, Zhang Y, Shao C, Sun W, Zhang J, Gao Y. Urine proteomic

characterization of active and recovered COVID-19 patients. bioRxiv; 2023. doi: 10.1101/2023.03.12.532269. PPR:PPR629203.

[27] Lagos-Cabré R, Alvarez A, Kong M, Burgos-Bravo F, Cárdenas A, Rojas-Mancilla E, Pérez-Nuñez R, Herrera-Molina R, Rojas F, Schneider P, Herrera-Marschitz M, Quest AFG, van Zundert B, Leyton L. αβ Integrin regulates astrocyte reactivity. J Neuroinflammation. 2017 Sep 29;14(1):194. doi: 10.1186/s12974-017-0968-5. PMID: 28962574; PMCID: PMC5622429.v3

[28] Liu C, Wang Y, Smallwood PM, Nathans J. An essential role for Frizzled5 in neuronal survival in the parafascicular nucleus of the thalamus. J Neurosci. 2008 May 28;28(22):5641-53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1056-08.2008. PMID: 18509025; PMCID: PMC6670808.

[29] Koszinowski S, Buss K, Kaehlcke K, Krieglstein K. Signaling via the transcriptionally regulated activin receptor 2B is a novel mediator of neuronal cell death during chicken ciliary ganglion development. Int J Dev Neurosci. 2015 Apr;41:98-104. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2015.01.006. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25660516.

[30] Alder J, Lee KJ, Jessell TM, Hatten ME. Generation of cerebellar granule neurons in vivo by transplantation of BMP-treated neural progenitor cells. Nat Neurosci. 1999 Jun;2(6):535-40. doi: 10.1038/9189. PMID: 10448218.

[31] Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009 Aug;10(8):513-25. doi: 10.1038/nrm2728. Epub 2009 Jul 15. PMID: 19603039.

[32] Sultana P, Novotny J. Rab11 and Its Role in Neurodegenerative Diseases. ASN Neuro. 2022 Jan-Dec;14:17590914221142360. doi: 10.1177/17590914221142360. PMID: 36464817; PMCID: PMC9726856.

[33] Anderson TN, Hinson HE. Damaged: Elevated GFAP and UCH-L1 as the Black Flag of Brain Injury. Resuscitation. 2020 Sep;154:110-111. doi: 10.1016/j.resuscitation.2020.07.002. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32652118; PMCID: PMC8101054.

[34] Rhine T, Babcock L, Zhang N, Leach J, Wade SL. Are UCH-L1 and GFAP promising biomarkers for children with mild traumatic brain injury? Brain Inj. 2016;30(10):1231-8. doi: 10.1080/02699052.2016.1178396. Epub 2016 Jul 14. PMID: 27416022; PMCID: PMC5818714.

[35] Chen F, Vitry S, Hocquemiller M, Desmaris N, Ausseil J, Heard JM. alpha-L-Iduronidase transport in neurites. Mol Genet Metab. 2006 Apr;87(4):349-58. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.11.017. Epub 2006 Jan 24. PMID: 16439176.

[36] Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sadovnick AD, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z, Eriksen J, Robinson T, Zehr C, Dickey CA, Crook R, McGowan E, Mann D, Boeve B, Feldman H, Hutton M.

Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. Nature. 2006 Aug 24;442(7105):916-9. doi: 10.1038/nature05016. Epub 2006 Jul 16. PMID: 16862116.

[37] Gass J, Cannon A, Mackenzie IR, Boeve B, Baker M, Adamson J, Crook R, Melquist S, Kuntz K, Petersen R, Josephs K, Pickering-Brown SM, Graff-Radford N, Uitti R, Dickson D, Wszolek Z, Gonzalez J, Beach TG, Bigio E, Johnson N, Weintraub S, Mesulam M, White CL 3rd, Woodruff B, Caselli R, Hsiung GY, Feldman H, Knopman D, Hutton M, Rademakers R. Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. Hum Mol Genet. 2006 Oct 15;15(20):2988-3001. doi: 10.1093/hmg/ddl241. Epub 2006 Sep 1. PMID: 16950801.

[38] Mukherjee O, Wang J, Gitcho M, Chakraverty S, Taylor-Reinwald L, Shears S, Kauwe JS, Norton J, Levitch D, Bigio EH, Hatanpaa KJ, White CL, Morris JC, Cairns NJ, Goate A. Molecular characterization of novel progranulin (GRN) mutations in frontotemporal dementia. Hum Mutat. 2008 Apr;29(4):512-21. doi: 10.1002/humu.20681. PMID: 18183624; PMCID: PMC2756561.

[39] Su F, Bai F, Zhang Z. Inflammatory Cytokines and Alzheimer's Disease: A Review from the Perspective of Genetic Polymorphisms. Neurosci Bull. 2016 Oct;32(5):469-80. doi: 10.1007/s12264-016-0055-4. Epub 2016 Aug 27. PMID: 27568024; PMCID: PMC5563762.

[40] Krabbe G, Minami SS, Etchegaray JI, Taneja P, Djukic B, Davalos D, Le D, Lo I, Zhan L, Reichert MC, Sayed F, Merlini M, Ward ME, Perry DC, Lee SE, Sias A, Parkhurst CN, Gan WB, Akassoglou K, Miller BL, Farese RV Jr, Gan L. Microglial NFκB-TNFα hyperactivation induces obsessive-compulsive behavior in mouse models of progranulin-deficient frontotemporal dementia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 May 9;114(19):5029-5034. doi: 10.1073/pnas.1700477114. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28438992; PMCID: PMC5441749.

[41] Lorenzl S, Buerger K, Hampel H, Beal MF. Profiles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in plasma of patients with dementia. Int Psychogeriatr. 2008 Feb;20(1):67-76. doi: 10.1017/S1041610207005790. Epub 2007 Aug 15. PMID: 17697439.

[42] Tuna G, Yener GG, Oktay G, İşlekel GH, Kİrkalİ FG. Evaluation of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) and Their Tissue Inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in Plasma from Patients with Neurodegenerative Dementia. J Alzheimers Dis. 2018;66(3):1265-1273. doi: 10.3233/JAD-180752. PMID: 30412498.

[43] Wennström M, Nielsen HM. Cell adhesion molecules in Alzheimer's disease. Degener Neurol Neuromuscul Dis. 2012 Jul 4;2:65-77. doi: 10.2147/DNND.S19829. PMID: 30890880; PMCID: PMC6065556.

[44] Ghasemi M, Keyhanian K, Douthwright C. Glial Cell Dysfunction in *C9orf72*-Related Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. Cells. 2021 Jan 28;10(2):249. doi: 10.3390/cells10020249. PMID: 33525344; PMCID: PMC7912327.

[45] Marinelli S, Marrone MC, Di Domenico M, Marinelli S. Endocannabinoid signaling in microglia. Glia. 2023 Jan;71(1):71-90. doi: 10.1002/glia.24281. Epub 2022 Oct 12. PMID: 36222019.

[46] Valori CF, Sulmona C, Brambilla L, Rossi D. Astrocytes: Dissecting Their Diverse Roles in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. Cells. 2023 May 23;12(11):1450. doi: 10.3390/cells12111450. PMID: 37296571; PMCID: PMC10252425.

[47] McCauley ME, Baloh RH. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. Acta Neuropathol. 2019 May;137(5):715-730. doi: 10.1007/s00401-018-1933-9. Epub 2018 Nov 21. PMID: 30465257; PMCID: PMC6482122.

[48] Cagnin A, Rossor M, Sampson EL, Mackinnon T, Banati RB. In vivo detection of microglial activation in frontotemporal dementia. Ann Neurol. 2004 Dec;56(6):894-7. doi: 10.1002/ana.20332. PMID: 15562429.

[49] Borrego-Écija S, Pérez-Millan A, Antonell A, Fort-Aznar L, Kaya-Tilki E, León-Halcón A, Lladó A, Molina-Porcel L, Balasa M, Juncà-Parella J, Vitorica J, Venero JL, Deierborg T, Boza-Serrano A, Sánchez-Valle R. Galectin-3 is upregulated in frontotemporal dementia patients with subtype specificity. Alzheimers Dement. 2024 Mar;20(3):1515-1526. doi: 10.1002/alz.13536. Epub 2023 Nov 29. PMID: 38018380; PMCID: PMC10984429.

[50] Bright F, Werry EL, Dobson-Stone C, Piguet O, Ittner LM, Halliday GM, Hodges JR, Kiernan MC, Loy CT, Kassiou M, Kril JJ. Neuroinflammation in frontotemporal dementia. Nat Rev Neurol. 2019 Sep;15(9):540-555. doi: 10.1038/s41582-019-0231-z. Epub 2019 Jul 19. PMID: 31324897.

[51] Merlini M, Rafalski VA, Rios Coronado PE, Gill TM, Ellisman M, Muthukumar G, Subramanian KS, Ryu JK, Syme CA, Davalos D, Seeley WW, Mucke L, Nelson RB, Akassoglou K. Fibrinogen Induces Microglia-Mediated Spine Elimination and Cognitive Impairment in an Alzheimer's Disease Model. Neuron. 2019 Mar 20;101(6):1099-1108.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2019.01.014. Epub 2019 Feb 5. PMID: 30737131; PMCID: PMC6602536.

[52] Karayel O, Virreira Winter S, Padmanabhan S, Kuras YI, Vu DT, Tuncali I, Merchant K, Wills AM, Scherzer CR, Mann M. Proteome profiling of cerebrospinal fluid reveals biomarker candidates for Parkinson's disease. Cell Rep Med. 2022 Jun 21;3(6):100661. doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100661. PMID: 35732154; PMCID: PMC9245058.

[53] Wu JQ, Qin WW, Pan L, Wang XR, Zhang B, Shan GL, Gao YH. Regional Differences of the Urinary Proteomes in Healthy Chinese Individuals. Chin Med Sci J. 2019 Sep 30;34(3):157-167. doi: 10.24920/003504.

PMID: 31601298.